

## MIKOTOXINOK MONITORINGJA MUSTOK ÉRÉSI FOLYAMATÁBAN

Csutorás Csaba<sup>1</sup> – Rácz<sup>1</sup> László – Fűtő Péter<sup>1</sup> – Forgó Péter<sup>1</sup> –  
Kiss Attila<sup>1</sup> – Tajcs Zsolt<sup>2</sup> – Rácz Kinga<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Élelmiszer tudományi Intézet, Eszterházy Károly Főiskola,  
H-3300 Eger, Leányka u. 6.

Email: [csuti@ektf.hu](mailto:csuti@ektf.hu)

<sup>2</sup> Egri Korona Borház Kft., H-3395 Demjén 0183/5 hrsz.

### **Abstract: Monitoring myco-toxins in the fermentation process of must**

Ochratoxin A (OTA) and aflatoxin B1 (AFB1) are the most abundant and the most toxic among toxins. The International Agency for Research on Cancer has classified ochratoxin A as a possible human carcinogen (category 2B). The occurrence of OTA and AFB1 in wine samples has been reported in various studies predominantly dealing with European wines but also with wines of other regions. Generally red wines seem to contain a higher amount of OTA than white or rosé wines, and some results suggest, that at least for European and North African cultivation areas, southern regions are more affected by the contamination problem. The aim of the present work was to investigate the change of OTA and AFB1 content during must fermentation processes, using artificial contamination of must samples with OTA and AFB1 of higher than 98% purity. Different concentrations of the toxins combined with different sort of wines (white, rosé, red) were applied. Our experiments were carried out in laboratorial as well as in industrial scale, and demonstrated the level of OTA and AFB1 content in must and wine during fermentation. Sample collections and preparations were carried out systematically, the prepared samples were analyzed by HPLC-MS and by HPLC.

### **1. Bevezetés:**

Az Ochratoxin A-t bor kontaminánsként először 1996-ban detektálták, Európában 1999-ben [1]. Az Európa szerte végzett kutatások kimutatták, hogy az *Asp. carbonarius* a leginkább felelős az OA termelésért a szőlőkben, borkészítéshez használt gyümölcsökben és borokban. Európában végzett boranalízisek bebizonyították, hogy az OA koncentrációja csökkenést mutatott, a vörösbor tartalmazza a legtöbbet, a rozé és a fehér bor előtt. Európában sajnos kevesen tudják azt, hogy a főbb klímaviszonyok a betakarítást megelőzően szoros kap-

csolatban állnak a szőlők, borok OA-tartalmával. Görögországban a száraz vörösbor OA-tartalma kevésbé különbözik a rozé és fehér borok toxintartalmától. A cereáliák után a bor a felelős a napi OA bevitelért. A korai szőlőérés és a szüretelés között eltelt idő, mint kritikus periódus és a faktorok képesek befolyásolni a gombák növekedését és az OA termelést. A meteorológiai állapotok megfelelő monitorozása szükséges ez idő alatt. Úgy tűnik, hogy az OA nem szabadul fel teljesen a szőlőből a bogyók zúzásakor, részben a macerálás növelheti még az OA mennyiségét, a fermentáció során viszont ez az érték csökken, mivel a keletkező alkohol gátolja a gombák növekedését, így a toxintermelést is.

A borok OA-val való szennyeződését a penészgombák szőlőszemeken való megtelepedése okozza [2]. Annak ellenére, hogy a *Penicillium verrucosum* és az *Aspergillus ochraceus* tekinthetők a legfőbb OA termelő fajoknak, mégsem ezek alkotják a szőlő normál mikrobiótáját. Mellettük főképp az *Asp. carbonarius* és az *Asp. niger* a felelős a szőlők, borok és a szárított, borkészítésre használt gyümölcsök szennyezéséért.

Különböző elfogadott szőlőtermesztési gyakorlatok, mint például peszticidek használata, eltérő termesztési módok, a leszüretelt szőlő megfelelő körülmények közötti tárolása, előkészítések módjai, a fermentáció ideje és hőmérséklete, mind-mind képesek befolyásolni a mikotoxinok felhalmozását/akkumulálását [3]. Mikotoxinok jelenléte borokban, gyümölcsleveken a nem megfelelő mezőgazdasági eljárásnak köszönhető. Megfelelő termesztési eljárások betartásával – megfelelő válogatás, kezelés, tárolás, szemezés és mosás – biztosítható, hogy a gyümölcslevek és borok nem tartalmazzanak a megengedett értéknél több maradék mikotoxint.

Spanyolország vezető helyen áll a minőségi borok gyártásában [4]. Nagyjából a világ bortermesztő vidékének 15%-a található itt, és a világ bor előállításának 11%-át bonyolítják le ebben az országban. A spanyol borok több mint 50 csoportba sorolhatók, és mindegyik különbözik a másiktól. Úgy tűnik, hogy néhány bor Európa déli borvidékeiről és Afrika északi borvidékeiről magasabb OA tartalommal rendelkezik, mint az északabbi területeken termelt borok. Ugyanez elmondható Argentínára, Brazíliára és Franciaországra is.

A szennyezett borok OA-tartalma egyes anyagokkal megköthető, csökkenthető, ilyenek például a zselatin, kazein, tojás albumin [5]. A kutatások eredményei azt mutatják, hogy az aktív szén egy hatékony ágens, mely felhasználható az OA eltávolítására pufferelt oldatokban, és fehér borban egyaránt, míg a bentonit kisebb affinitást mutat az OA megkötésére.

Számos tanulmány azt mutatta, hogy kapcsolat lelhető fel az OA jelenléte és a fehérjeszintézis között [6]. Valójában az köztudott volt, hogy az OA nagy koncentrációban DNS melléktermék keletkezéséhez és a kismag formációváltozásához vezethet, és megzavarja a sejt szintű fehérjeszintézist.

Újabb kutatások kimutatták, hogy a borok jelentős mértékben tartalmazzak OA-t [7]. Az OA borban való előfordulását először Svájcban írták le. Az elmúlt

évtizedekben számos európai országban – Skandinávia, Mediterrán Tengeri Országok, Balkán - kimutatták az OA jelenlétét borokban. Az OA mennyisége a borokban nagymértékben változó, ugyanis nagyban függ a borkészítés minőség-irányításától. Egy kutatás keretében, Törökország négy egymástól nagyban különböző klímájú területén készült borok OA tartalmát vizsgálták meg és hasonlították össze. Azt tapasztalták, hogy a forró nyarú, magas páratartalmú mediterrán területeken termelt borok OA tartalma volt a legmagasabb. Hasonló kutatásokat végeztek Spanyolországban és Olaszországban is, és az eredmények hasonlóan alakultak, mint a török példa esetén [8].

Fernandes és mts. kijelentették, hogy a must OA tartalma magasabb a boréhoz képest, mert a biomassa jelenléte a mustban kedvezően hathat a felületén lejátszódó adszorpció révén az OA mennyiségének csökkenésére. Ezt a sejtfalak negatív töltési tulajdonságával és az OA savas tulajdonságával magyarázták. Bau és mts.-i állították, hogy az OTA termelésének kockázata a szőlő érlelésével csökken, ami azt jelenti, hogy megfelelő higiéniai állapot szükséges ahhoz, hogy a bort megóvjuk a szennyezéstől.

Az aflatoxinok az *Aspergillus flavus*, illetve *Asp. parasiticus* fonalas gombák által termelt erősen toxikus másodlagos anyagcseretermékek. Számukra kedvező hőmérsékletű és páratartalmú körülmények között bizonyos élelmiszereken, ételeken nőnek, és mikotoxint termelnek. Az aflatoxinokat a mezőgazdasági termékek természetes szennyezőiként tartják számon. A legerősebb szennyezést kukoricában, mogyoróban, gyapotmagban, és más gabonanövényekben mutatták ki. Az aflatoxinok közül a legismertebb a B1, B2, G1 és G2 típus, melyek közül a B1 emelkedik ki, mint legveszélyesebb toxikus anyag. Az Európai Bizottság 2 ng/g-ban maximálta az aflatoxin B1 mennyiségét az élelmiszerekben, habár az új limitek 1 ng/g-ban határozzák meg ezt az értéket. Habár eddig nem volt elérhető információ aflatoxin szőlőben való előfordulásáról, nemrégiben megjelent kutatások kimutatták az *Asp. flavus* nagyon alacsony számát mediterrán területekről származó szőlőkben. Azonban az aflatoxin B1 mennyiségéről nincs adat az értekezésben [9]. A borvidék különböző területeiről vett 10 szőlőfürtből készült mintákat extrahálták és HPLC módszerrel, valamint standard használatával vizsgálták a szőlők aflatoxin B1 tartalmát 0,01 µg/l kimutatási határérték mellett. Szerencsére csak a táptalajon nevelt gombáknál tapasztaltak toxintermelést, a borban nem.

Tunézia borvidégeiről vett szőlőminták aflatoxin B1 és ochratoxin A tartalmát vizsgálták a kutatók [10]. Nagyjából 100 *Aspergillus* izolátumban az *Asp. niger* 70%-ban, az *Asp. carbonarius* 7%-ban és az *Asp. flavus* 23%-ban fordult elő. Baktériumtenyészetekben tesztelték az izolátumok mikotoxintermelő képességét. A legmagasabb OA termelési szintet az *Asp. carbonarius* izolátumok 80%-a produkálta, miközben az *Asp. niger* izolátumok csak 5%-a termelt OA-t. Továbbá az *Asp. flavus* izolátumok 39% termelt AFB1-et 21–54 µg/g mennyi-

ségben. Továbbá először demonstrálták, hogy a *Penicillium* izolátumok 3%-a mutatott OA termelést szőlőkben.



## 2. Eredmények:

Munkánk során laboratóriumi vizsgálati módszert fejlesztettünk ki fehér, rosé és vörös borok érési folyamatában az AFB1 és OA tartalom nyomonkövetésére. A vizsgálati edényeink 4 literesek voltak, illetve a léptéknövelő kísérleteink előkészítéséhez 25 literes ballonokat is alkalmaztunk. Az említett űrtartalmú edényekbe kerültek a különbözőképpen előkészített must minták (kénezéses előkészítéssel, vagy anélkül; kétféle fajélesztő adagolásával, illetve anélkül; mindenféle előkezelés nélkül), melyekhez különböző mennyiségű (0,5–1,0–2,0–4,0 ppm) 99%-os tisztaságú AFB1, illetve OA toxinokat adagoltunk. A nyomonkövetési vizsgálatokban több időpontban mintavétel történt a must fermentációja során, a mustmintákat feldolgozásukig  $-18^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk (**1–4. képek**).



1. kép: Mikotoxinnal szennyezett mustminták

- Fehérszőlő mustja (Hárslevelű)
- Kékszőlő mustja (Kékfrankos)
- Vörösbor (Zweigelt)
- Mustkénezés (10 g/l)
- Fajélesztő használata (2 féle, illetve vadélesztés)



2. kép: Mintavételezés a kísérleti mustmintákból

## Összesen 144 minta

	Kénezeve, faj élesztő 1	Kénezeve, faj élesztő 2	Kénezés nélkül, fajélesztő 1	Kénezés nélkül, vadélesztő
Fehér	24	24	24	24
Rozé	24	-	-	-
Vörös	24	-	-	-

**Mikotoxin**

Sorszám	Megnevezés	Koncentráció	Megnevezés
1.	Alfatoxin B1 Fehér bors	0,5 ppm	Fajélesztő 1 Kénezeve

**24 minta:**  
**2 toxin**  
**x 4 koncentráció**  
**x 3 párhuzamos mérés**



3. kép: Vizsgálati minták száma, címke minta képe a vizsgálatok nyilvántartásából

**Minta beállításától  
eltelt napok száma**

	0.	1.	2.
<b>F</b>	2	20	93
<b>R/V</b>	2	13	86

+seprőminta



Mintavétel: 100 ml „húzott” minta

4. kép: Mintavételek száma, kivitelezése

A mélyfagyasztott mustminták feldolgozására sikerült egy egyszerű, gazdaságos, hatékony módszert kidolgoznunk, mely mindkét típusú toxin esetében kiválóan alkalmasnak bizonyult. Az általunk kidolgozott mintaelőkészítési eljárás során a következő lépéseket alkalmazzuk:

A 100 ml must, illetve bormintából 80 ml-t négyszeres extrakciónak vetünk alá, mely során acetonitrilt használunk oldószerként, minden extrakcióban 30-30 ml-t. A négy extrakcióból összegyűjtésre kerülő oldószer mennyiség általában 115-125 ml körül alakul. Az elválasztás megkönnyítése érdekében centrifugát használunk, 5 percig 3800 rpm sebességgel.





5. kép: Mintaelőkészítés a laboratóriumban

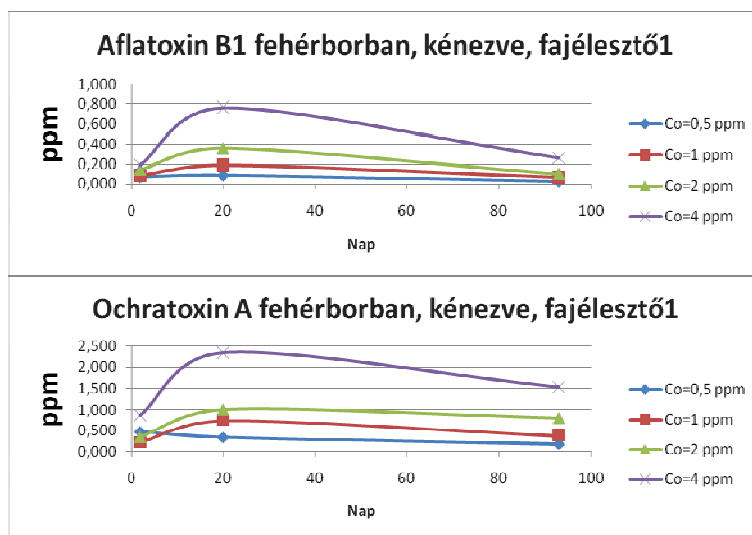
Az összegyűjtött oldatot szárazra pároljuk rotációs vákumbepárló berendezésen, majd a visszamaradt anyagot 10 ml acetonitrillel visszaoldajuk, melyből 2 ml-t veszünk ki a további vizsgálat céljából. A kivett mintát újabb centrifugálás után, mely 10 percig 9000 rpm fordulaton történik, mélyhűtőben tároljuk. Az elemzés előtt a mintákat fecskendő elötétészűrővel megsűrjük úgy, hogy legalább 1,5 ml víztől és szilárd szemcséktől mentes acetonitril oldatot kapjunk, mely alkalmas HPLC, illetve HPLC-MS vizsgálatokra **(5. kép)**.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerrel történő koncentráció meghatározásához Shimadzu LCMS-2010 EV HPLC készüléket használunk, diódasoros detektorral (DAD) kapcsolva **(6. kép)**.

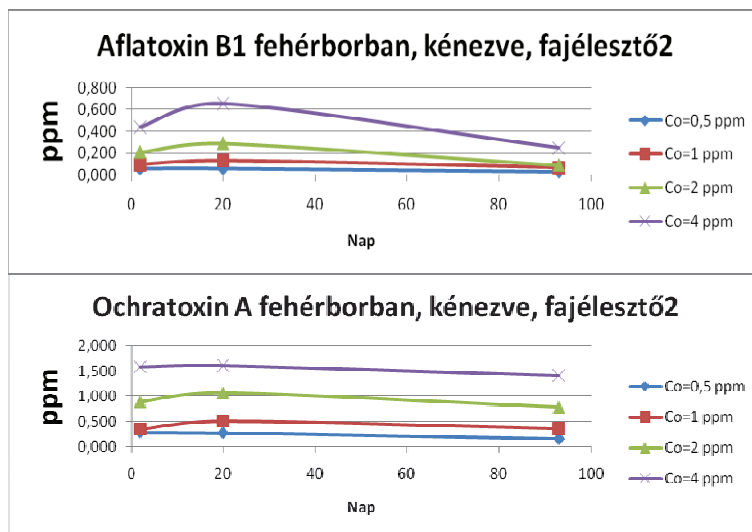


6. kép: HPLC-MS készülékünk

A 144 minta elemzésével kapott eredményeinket az 1-6. ábrákon tettük könnyen értelmezhetővé. Az ábrákat úgy csoportosítottuk, hogy egyszerűen áttekinthetőek legyenek, illetve a szükséges következtetéseket levonhassuk az ábrák elemzéséből.

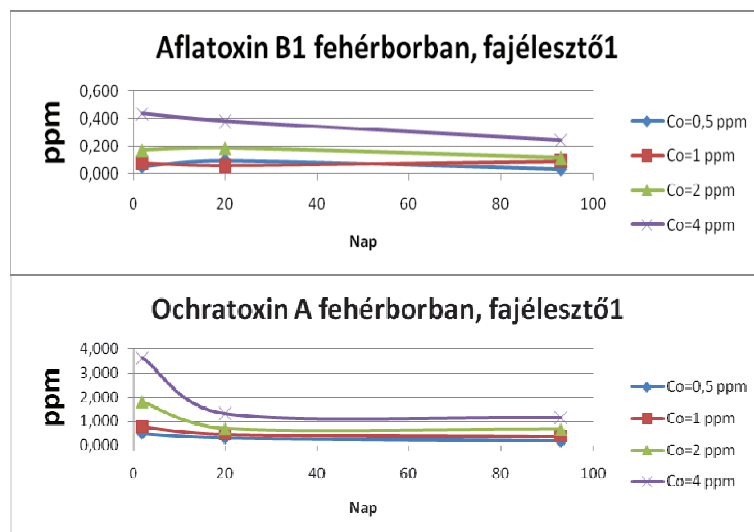


1. ábra: Mérési eredmények – 1. sorszám

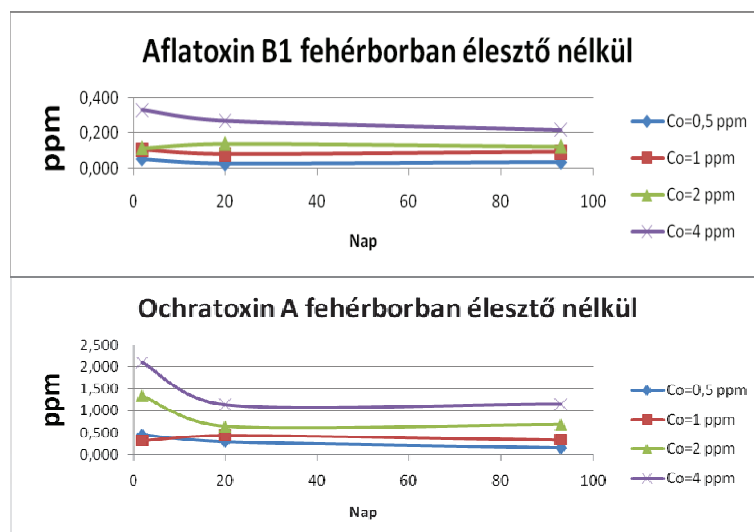


2. ábra: Mérési eredmények – 2. sorszám

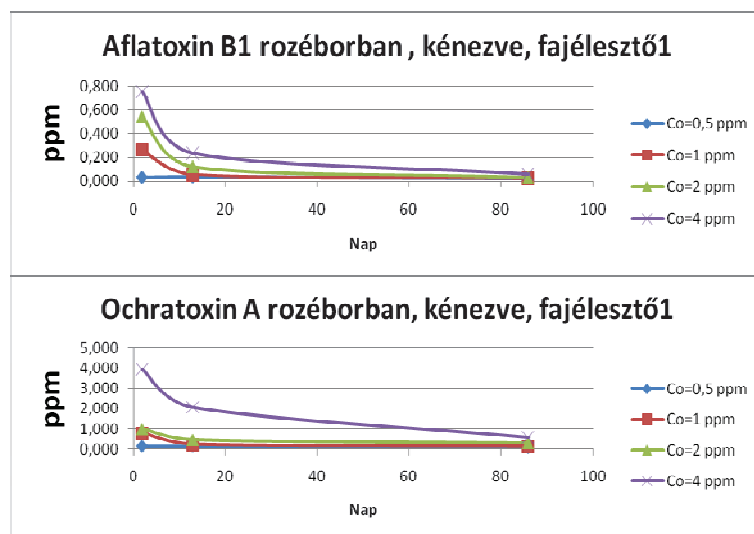




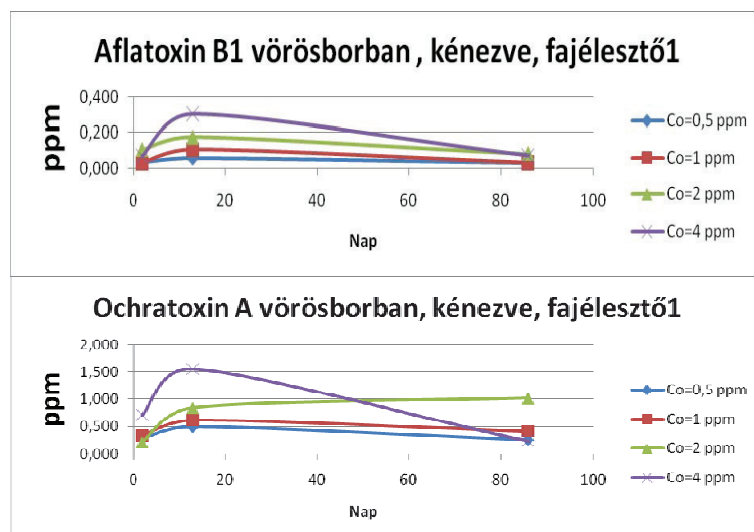
3. ábra: Mérési eredmények - 3. sorszám



4. ábra: Mérési eredmények – 4. sorszám



5. ábra: Mérési eredmények – 5. sorszám



6. ábra: Mérési eredmények – 6. sorszám

### 3. Az eredmények értékelése:

A mérési eredményeink nagyszerű képet mutatnak számunkra ezen két különböző szerkezeti csoportba sorolható toxin különböző viselkedéséről. Az aflatoxin B1 egyértelműen alacsonyabb fokú kockázatot jelent a borászati termékpálya esetében, ami egyértelműen rossz víz oldékonyságában, illetve mérsékelt alkoholban való oldékonyságában keresendő. A mért legnagyobb mennyiség sem érte el a 0,8 ppm koncentrációt, mely az induló 0,1–0,3 ppm mennyiségekről a must érése során keletkező alkohol hatására az érés kezdeti szakaszában növekedett, majd egy idő után a seprőben kezdett újra halmozódni, míg az oldott mennyiség csökkent. Az említett 0,8 ppm mennyiséget is csak egy esetben közelítette meg az adott vizsgálati minta, míg a hozzáadott 4 ppm toxinmennyiség többi hányada már akkor is feltehetően a seprőben gyűlt össze. További vizsgálatainkban a seprő elemzését is el kívánjuk végezni többek között ennek tisztázására is.

Az ochratoxin A azonban a szakirodalmi várakozásainknak megfelelően vizsgálatainkban is fokozott oldékonyságával tűnt ki, mind a vizes és méginkább az alkoholos oldatokban. A must érése során a két toxin hasonló viselkedést mutatott a tekintetben, hogy a kezdeti alacsonyabb mért értékek után az alkoholtartalom növekedésével nagyobb koncentrációkat mértünk, mely egy mutatott maximum érték után csökkenő tendenciát kapott. Kiemelnénk, hogy a bor érése során fokozatosan csökken mindkét toxin mennyisége a borban, valószínűleg a seprőben ugyanilyen arányban növekszik. További vizsgálatainkban kívánjuk ezt igazolni, a seprőből vett minták analízisével.

A vizsgálati eredményeink egyértelműen igazolták, hogy mindkét toxin esetében az oldatba jutásának, illetve ott tartásának a feltétele nemcsak az alkoholtartalomban keresendő, hanem közvetlen összefüggés mutatkozik az élesztő jelenléte és a toxin oldatba kerülése között. Az élesztő minőségétől függően is változik a toxinok jelenléte a vizsgált mintákban, igazolhatóan a vadélesztők segítik leginkább, majd a vizsgált 1-es és 2-es számú fajélesztők következnek a sorban a toxinok oldatba kerülésének elősegítésében. A borászatokban napjainkban alkalmazott must-képezés gyakorlatilag a vadélesztőket eliminálja a borkészítés során, ami kedvező az előbb említett okokból is. Véleményünk szerint a délvidéki országokban, ahol a toxinszennyezés valós probléma, érdemes lenne megfelelő élesztőtörzseket keresni, melyek a toxinok oldatba kerülését nem segítik, viszont a bor erjesztését elvégzik. Lényegesen befolyásolható lehet ilyen módon a borban lévő toxinok mennyisége, még esetlegesen toxinnal szennyezett must feldolgozásával is.

#### 4. Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet kívánnak mondani a Nemzeti Fejlesztési Ügynökségnek, hogy a munkát a GOP-1.1.1 pályázat keretében támogatta.

#### Irodalomjegyzék

1. P.Battilani, N. Magan, A. Logrieco: European research on ochratoxin A in grapes and wine; *International Journal of Food Microbiology* **111** (2006) S2-S4.
2. N. Bellí, M. Bau, S. Marín, M.L. Abarca, A.J. Ramos, M.R. Bragulat: Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes; *International Journal of Food Microbiology* **111** (2006) S40-S45.
3. N. Delage, A. d'Harlingue, B. Colonna Ceccaldi, G. Bompeix: Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine; *Food Control* **14** (2003) 225–227.
4. M. Bau, M.R. Bragulat, M.L. Abarca, S. Mínguez, F.J. Cabanes: Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes; *International Journal of Food Microbiology* **98** (2005) 125–130.
5. Var, B. Kabak, Z. Erginkaya: Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite; *Food Control* **19** (2008) 592–598.
6. G. Meca, G. Blaiotta, A. Ritieni: Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato; *Food Control* **21** (2010) 579–583. 76.
7. I.Var, B. Kabak: Occurrence of ochratoxin A in Turkish wines; *Microchemical Journal* **86** (2007) 241–247.
8. N. Ratola, E. Abade, T. Simoes, A. Venancio: Evolution of ochratoxin A content from must to wine in Port Wine microvinification; *Anal. Bioanal. Chem.* **382** (2005) 405–411.
9. EL Khoury, T. Rizk, R. Lteif, H. Azouri, M.L. Delia, A. Lebrihi: Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts; *Food and Chemical Toxicology* **46** (2008) 2244–2250.
10. S. Melki Ben Frejd, S. Chebil, A. Mliki: Isolation and characterisation of ochratoxin A and aflatoxin B1 producing fungi infecting grapevines cultivated in Tunisia; *African Journal of Microbiology Research* **3**(9) (2009) 523–527.